亚麻籽油对脂多糖刺激仔猪肝脏TLR4和NOD信号通路关键基因表达的影响

陈少魁　刘玉兰*　王海波　王秀英　朱惠玲　张　晶　王树辉　涂治骁

（武汉轻工大学动物营养与饲料科学湖北省重点实验室，武汉　430023）

摘　要：本试验旨在研究亚麻籽油对脂多糖（LPS）刺激仔猪肝脏Toll样受体4（TLR4）和核苷酸结合寡聚化结构域（NOD）信号通路关键基因表达的影响。选取24头断奶仔猪，按体重相近原则随机分为4个组，分别为对照组、LPS组、2.5%亚麻籽油组（2.5%亚麻籽油+LPS）、5.0%亚麻籽油组（5.0%亚麻籽油+LPS），每组6个重复，每个重复1头猪，试验期21 d。试验组注射100 μg/kg体重的LPS，对照组注射等量的生理盐水。注射LPS或生理盐水4 h后屠宰仔猪，取肝脏，测定TLR4和NOD信号通路关键基因及相关炎性介质的mRNA表达水平。结果表明：1）LPS刺激显著提高了肝脏肿瘤坏死因子-α（*TNF-α*）、环氧酶2（*COX*2）、热休克蛋白70（*HSP*70）的mRNA相对表达量（$P<0.05$），2.5%亚麻籽油可显著降低*COX*2、*TNF-α*的mRNA相对表达量（$P<0.05$），5.0%亚麻籽油可显著降低*TNF-α*的mRNA相对表达量（$P<0.05$）。2）LPS刺激显著提高了肝脏*TLR*4、髓样分化因子88（*MyD*88）、白细胞介素-1受体相关激酶1（*IRAK*1）、*NOD*1、*NOD*2、受体互作蛋白2（*RIPK*2）、核因子-*κB*（*NF-κB*）的mRNA相对表达量（$P<0.05$）；2.5%亚麻籽油可显著降低*NOD*1、*NOD*2的mRNA相对表达量（$P<0.05$），有降低*RIPK*2 mRNA相对表达量的趋势（$P<0.10$）；5.0%亚麻籽油可显著降低*NOD*2的mRNA相对表达量（$P<0.05$）。这表明LPS刺激导致仔猪发生炎症反应，亚麻籽油可能通过抑制NOD信号通路进而缓解肝脏炎症反应。

关键词：仔猪；亚麻籽油；脂多糖；肝脏；TLR4；NOD

中图分类号：S828；S816.43　　　文献标识码：A　　　文章编号：

肝脏是机体的新陈代谢中心，同时也是体内的主要解毒和免疫防御器官。饲养环境中的致病性和非致病性抗原会刺激仔猪肝脏巨噬细胞产生、释放大量炎性介质，进而造成肝脏结构和功能损伤，最终导致生长抑制[1]。因此，通过营养手段来调控炎性介质的大量产生，对缓解肝脏损伤具有重要意义，也是缓解炎症的有效手段。

收稿日期：2015-08-18

资助项目：湖北省自然科学基金杰出青年人才项目（2013CFA029）

作者简介：陈少魁(1989-)，男，湖北荆州人，硕士研究生，从事猪营养生理机能调控的研究。E-mail: loveskchen@163.com

*通信作者：刘玉兰，教授，硕士生导师，E-mail: yulanflower@126.com

亚麻籽油中含有大量α-亚麻酸（C18:3n-3），而α-亚麻酸是二十碳五烯酸（EPA）（C20:5n-3）和二十二碳六烯酸（DHA）（C22:6n-3）的前体。大量研究表明，n-3多不饱和脂肪酸（PUFA）（如 EPA 和 DHA）在急性化学肝损伤[1]、胆汁淤积性肝损伤[2]、糖尿病肝损伤[3]、脂肪肝[4]等一系列肝脏损伤模型中发挥着重要的保护作用。n-3 PUFA 的保护作用可能与其抑制炎性介质的过量产生有关[1-4]。但是，关于亚麻籽油发挥护肝作用的分子机理尚不清楚。

Toll 样受体 4（TLR4）和核苷酸结合寡聚化结构域（NOD）是调节天然免疫和获得性免疫反应的重要蛋白家族。其中 TLR4 信号通路关键基因包括 *TLR*4、髓样分化因子 88（*MyD*88）、白细胞介素-1 受体相关激酶 1（*IRAK*1）、肿瘤坏死因子受体相关因子 6（*TRAF*6），NOD 信号通路关键基因包括 *NOD*1、*NOD*2、受体互作蛋白 2（*RIPK*2）。研究发现，TLR4 和 NOD 被激活后，可激活各自下游的信号分子，最终激活核因子-κB（NF-κB），从而诱导炎性介质的表达，最终导致肝脏损伤[5]。因此，我们可以推测亚麻籽油可能通过 TLR4 和 NOD 信号通路，来调节炎性介质的产生，从而对肝脏损伤起调控作用。本研究通过给断奶仔猪注射脂多糖（LPS）诱导炎症，研究亚麻籽油对肝脏 TLR4 和 NOD 信号通路关键基因以及炎性介质表达水平的影响，旨在为探索亚麻籽油是否通过调控 TLR4 和 NOD 信号通路进而缓解肝脏炎性损伤提供初步依据。

1　材料与方法

1.1　试验动物与设计

选择 24 头平均体重为（6.98±0.05） kg 的“杜×长×大”断奶仔猪，按体重相近原则，随机分为 4 个组，分别为对照组（5.0%玉米油）、LPS 组（5.0%玉米油+LPS）、2.5%亚麻籽油组（2.5%玉米油+2.5%亚麻籽油+LPS）、5.0%亚麻籽油组（5.0%亚麻籽油+LPS），每组 6 个重复，每个重复 1 头猪，试验期 21 d。玉米油由山东西王食品有限公司提供，亚麻籽油由甘肃陇郁香粮油工业有限责任公司提供。玉米油和亚麻籽油脂肪酸组成见表 1。试验第 21 天，LPS 组、2.5%亚麻籽油组和 5.0%亚麻籽油组仔猪分别腹膜注射 100 μg/kg 体重的 LPS（大肠杆菌血清型 O55:B5，Sigma 公司），对照组仔猪注射等量生理盐水。LPS 注射剂量和作用时间参考前期研究结果[6-8]。前期研究表明，仔猪腹膜注射 100 μg/kg 体重的 LPS，4 h 后会产生炎症反应，且导致肝脏损伤。饲粮参照 NRC（2012）营养需要量配制，基础饲粮组成及营养水平见表 2。

表1　玉米油和亚麻籽油脂肪酸组成

Table 1　Fatty acid composition of the corn oil and flaxseed oil　　%

脂肪酸 Fatty acid	玉米油 Corn oil	亚麻籽油 Flaxseed oil
14:0	0.04	0.05
16:0	12.75	5.28
16:1n-7	0.10	0.07
18:0	1.85	3.79
18:1n-9	31.15	20.27
18:2n-6	52.14	15.14
18:3n-3	0.75	54.31
20:4n-6	ND	0.01
20:5n-3	ND	ND
22:6n-3	ND	ND

ND 表示低于检测线。ND mean below the detection line.

表 2　基础饲粮组成及营养水平（风干基础）

Table 2　Composition and nutrient levels of the basal diet (air-dry basis)　%

项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
玉米 Corn	56.00
豆粕 Soybean meal	22.00
麸皮 Wheat bran	3.00
鱼粉 Fish meal	5.50
玉米油或亚麻籽油 Corn oil or flaxseed oil	5.00
大豆浓缩蛋白 Soy protein concentrate	2.50
代乳粉 Milk replacer	3.00
石粉 Limestone	0.70
磷酸氢钙 $CaHPO_4$	1.00
食盐 NaCl	0.20
赖氨酸 Lysine	0.27

酸化剂 Acidifier	0.20
抗氧化剂 Antioxidant	0.05
防腐剂 Preservative	0.05
甜味剂 Sweetener	0.03
预混料 Premix[1)]	0.50
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient levels[2)]	
消化能 DE/(MJ/Kg)	14.00
粗蛋白质 CP	20.20
钙 Ca	0.90
总磷 TP	0.70
赖氨酸 Lys	1.35
蛋氨酸+半胱氨酸 Met+Cys	0.72

[1)]预混料为每千克饲粮提供 Premix provided the following per kg of diet：VA 12 000 IU，VD_3 2 500 IU，VE 30 IU，VK_3 3 mg，VB_{12} 18 μg，核黄素 riboflavin 4 mg，烟酸 nicotinic acid 40 mg，泛酸 pantothenic acid 15 mg，氯化胆碱 choline chloride 400 mg，叶酸 folic acid 700 μg，VB_1 1.5 mg，VB_6 3 mg，生物素 biotin 100 μg，Zn 80 mg，Mn 20 mg，Fe 83 mg，Cu 25 mg，I 0.48 mg，Se 0.36 mg。

[2)]消化能、赖氨酸、蛋氨酸+半胱氨酸为计算值，其余为实测值。DE, Lys and Met+Cys were calculated values, while the others were measured values.

1.2 样品采集

仔猪注射 LPS 或生理盐水 4 h 后，屠宰，取肝脏，立即投入液氮冻存，随后转移至-80 ℃冰箱保存，用于提取组织总 RNA。

1.3 mRNA 表达分析

1.3.1 主要仪器与试剂

7500 实时荧光定量聚合酶链式反应（Real-time PCR）仪（Applied Biosystems），梯度升降温功能 PCR 仪（TaKaRa），Nanodrop 2000 超微量分光光度计（Thermo），Tanon-4100 凝胶成

像系统（上海天能）。RNAiso Plus（Total RNA 提取试剂）、PrimeScript® RT reagent kit with gDNA eraser（cDNA 合成试剂盒）和 SYBR® Premix Ex Taq™（Tli RNaseH Plus）（Real-time PCR 试剂盒）均购自宝生物工程（大连）有限公司。

1.3.2　测定方法

组织总 RNA 提取、cDNA 合成、Real-time PCR 参照陈少魁等[9]的方法。Real-time PCR 数据计算采用 Livak 等[10]的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法，以甘油醛-3-磷酸脱氢酶（*GAPDH*）为内参基因。

1.3.3　引物设计与合成

根据 GenBank 中已发表的猪 *TLR*4、*MyD*88、*IRAK*1、*TRAF*6、*NOD*1、*NOD*2、*RIPK*2、*NF-κB*、肿瘤坏死因子-α（*TNF-α*）、环氧酶 2（*COX*2）、热休克蛋白 70（*HSP*70）、*GAPDH* 的基因序列，利用 Primer premier 6.0 软件设计 Real-time PCR 引物（表 3）。引物由宝生物工程（大连）有限公司合成。

表 3　基因的引物序列

Table 3　Primer sequences of genes

基因 Genes	引物序列 Primer sequence	退火温度 Annealing temperature/℃	扩增长度 Amplification length/bp	GenBank 序列号 GenBank accession No.
Toll 样受体 4 *TLR*4	F: TCAGTTCTCACCTTCCTCCTG R: GTTCATTCCTCACCCAGTCTTC	60	166	GQ503242.1
髓样分化因子 88 *MyD*88	F: GATGGTAGCGGTTGTCTCTGAT R: GATGCTGGGGAACTCTTTCTTC	60	148	AB292176.1
白细胞介素-1 受体相关激酶 1 *IRAK*1	F: CAAGGCAGGTCAGGTTTCGT R: TTCGTGGGGCGTGTAGTGT	60	115	XM_003135490.1
肿瘤坏死因子受体相关因子 6	F: CAAGAGAATACCCAGTCGCACA R: ATCCGAGACAAAGGGGAAGAA	60	122	NM_001105286.1

*TRAF*6				
核苷酸结合寡聚化结构域 1 *NOD*1	F: CTGTCGTCAACACCGATCCA R: CCAGTTGGTGACGCAGCTT	60	57	AB187219.1
核苷酸结合寡聚化结构域 2 *NOD*2	F: GAGCGCATCCTCTTAACTTTCG R: ACGCTCGTGATCCGTGAAC	60	66	AB195466.1
受体互作蛋白 2 *RIPK*2	F:CAGTGTCCAGTAAATCGCAGTTG R: CAGGCTTCCGTCATCTGGTT	60	206	XM_003355027.1
核因子-κB *NF-κB*	F:AGTACCCTGAGGCTATAACTCGC R: TCCGCAATGGAGGAGAAGTC	60	133	EU399817.1
肿瘤坏死因子-α *TNF-α*	F: TCCAATGGCAGAGTGGGTATG R: AGCTGGTTGTCTTTCAGCTTCAC	60	67	NM_214022.1
环氧酶 2 *COX*2	F: ATGATCTACCCGCCTCACAC R: AAAAGCAGCTCTGGGTCAAA	60	284	AY028583
热休克蛋白 70 *HSP*70	F: GCCCTGAATCCGCAGAATA R: TCCCCACGGTAGGAAACG	60	152	NM_001123127.1
甘油醛-3-磷酸脱氢酶 *GAPDH*	F: CGTCCCTGAGACACGATGGT R: GCCTTGACTGTGCCGTGGAAT	60	194	AF017079.1

1.4 统计分析

用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析和 LSD 多重比较，试验结果以平均值±标准误表示。$P<0.10$ 表示具有显著性趋势，$P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 亚麻籽油对 LPS 刺激仔猪肝脏 *COX*2、*HSP*70、*TNF-α* mRNA 相对表达量的影响

由表 4 可知，与对照组相比，LPS 刺激显著提高了仔猪肝脏 *COX*2、*HSP*70、*TNF-α* 的 mRNA 相对表达量（$P<0.05$）；与 LPS 组相比，饲粮添加 2.5%亚麻籽油可显著降低 *COX*2、*TNF-α* 的 mRNA 相对表达量（$P<0.05$），饲粮添加 5.0%亚麻籽油可显著降低 *TNF-α* 的 mRNA 相对表

达量（P<0.05）。

表 4　亚麻籽油对 LPS 刺激仔猪肝脏 *COX*2、*HSP*70 和 *TNF-α* mRNA 相对表达量的影响

Table 4　Effects of flaxseed oil on the mRNA relative expression levels of *COX*2, *HSP*70 and *TNF-α* in liver of piglets after LPS challenge

项目 Items	对照组 Control group	LPS 组 LPS group	2.5%亚麻籽油组 2.5% flaxseed oil group	5.0%亚麻籽油组 5.0%flaxseed oil group	P 值 P-value		
					P_1	P_2	P_3
环氧酶 2 *COX*2	1.00±0.15	9.78±1.66	4.12±0.88	7.18±2.03	0.001	0.015	0.234
热休克蛋白 70 *HSP*70	1.00±0.18	77.93±27.96	53.67±10.87	48.21±3.13	0.002	0.239	0.153
肿瘤坏死因子-α *TNF-α*	1.00±0.08	6.58±1.50	4.15±0.71	3.93±0.39	<0.001	0.041	0.028

P_1：对照组 vs. LPS 组；P_2：LPS 组 vs. 2.5%亚麻籽油组；P_3：LPS 组 vs. 5.0%亚麻籽油组。表 5 同。

$P_{1:}$ control group vs. LPS group; $P_{2:}$ LPS group vs. 2.5% flaxseed oil group; $P_{3:}$ LPS group vs. 5.0% flaxseed oil group. The same as Table 5.

2.2　亚麻籽油对 LPS 刺激仔猪肝脏 TLR4 和 NOD 信号通路关键基因相对表达量的影响

由表 5 可知，与对照组相比，LPS 刺激显著提高了仔猪肝脏 *TLR*4、*MyD*88、*IRAK*1、*NOD*1、*NOD*2、*RIPK*2、*NF-κB* 的 mRNA 相对表达量（P<0.05）；与 LPS 组相比，2.5%亚麻籽油可显著降低 *NOD*1、*NOD*2 的 mRNA 相对表达量（P<0.05），有降低 *RIPK*2 mRNA 相对表达量的趋势（P<0.10），5.0%亚麻籽油可显著降低 *NOD*2 mRNA 相对表达量（P<0.05）。

表 5　亚麻籽油对 LPS 刺激仔猪肝脏 TLR4 和 NOD 信号通路关键基因 mRNA 相对表达量的影响

Table 5　Effects of flaxseed oil on the mRNA relative expression levels of the key genes in TLR4 and NOD signaling pathway in liver of piglets after LPS challenge

项目 Items	对照组 control group	LPS 组 LPS group	2.5%亚麻籽油组 2.5% flaxseed oil group	5.0%亚麻籽油组 5.0%flaxseed oil group	*P* 值 *P*-value		
					P_1	P_2	P_3
Toll 样受体 4 *TLR*4	1.00±0.11	2.28±0.55	1.78±0.25	1.71±0.23	0.013	0.268	0.209
髓样分化因子 88 *MyD*88	1.00±0.10	2.67±0.35	2.55±0.20	2.31±0.12	<0.001	0.696	0.229
白细胞介素-1 受体相关激酶 1 *IRAK*1	1.00±0.10	1.71±0.30	1.48±0.11	1.45±0.14	0.013	0.354	0.293
肿瘤坏死因子受体相关因子 6 *TRAF*6	1.00±0.15	1.22±0.21	1.16±0.12	1.15±0.14	0.355	0.771	0.761
核苷酸结合寡聚化结构域 1 *NOD*1	1.00±0.07	3.99±0.51	2.87±0.31	3.27±0.27	<0.001	0.024	0.131
核苷酸结合寡聚化结构域 2 *NOD*2	1.00±0.15	15.19±1.64	6.91±0.85	7.51±0.77	<0.001	<0.001	<0.001
受体互作蛋白 2 *RIPK*2	1.00±0.06	7.83±1.84	5.20±0.57	5.54±0.90	<0.001	0.076	0.120
核因子-κB *NF-κB*	1.00±0.10	1.80±0.13	1.92±0.12	1.90±0.12	<0.001	0.453	0.554

3　讨　论

目前诱导炎症的经典方法是腹膜或静脉注射一定剂量的LPS[11]，LPS也被广泛应用于仔猪肝脏损伤研究。前期研究证实，LPS 刺激可引起肝脏组织学损伤和功能紊乱[6-8]。肝脏中枯否细胞在LPS刺激后可分泌一系列炎性介质（如TNF-α），这些炎性介质在肝脏损伤中起重要作用[1]。有关亚麻籽油对猪肝脏损伤调控作用的研究较少。研究报道认为，亚麻籽油在老鼠肝脏损伤研究中的添加量为5%~10%[3-4]、在猪肠道损伤研究中的添加量为2%[12]。另外，结合养猪生产实践（油脂添加量通常不超过5%），本试验选择在饲粮中添加2.5%和5.0%的亚麻籽油来研究亚麻油是否可以缓解LPS诱导的仔猪肝脏炎症反应。

TNF-α和COX2是典型的炎性介质，在正常情况下不表达或表达量较低[2,6-7]。研究表明，这些炎性介质在炎症状态下表达量会急剧提高，是机体炎症反应的标志，LPS刺激会使这些炎性介质的表达量显著提高[2,6-7]。HSP通常被认为是一种对细胞具有保护作用的细胞内分子[13]，细胞内高水平HSP70可以降低炎症反应，促进肝再生[14]。研究表明，细胞内HSP70可直接与NF-κB相互作用，从而防止NF-κB的活化[15]。本试验结果表明，LPS刺激显著提高了仔猪肝脏*TNF-α*、*COX*2、*HSP*70的mRNA相对表达量，原因可能是LPS通过提高肝脏TNF-α 的表达量，经负反馈途径进一步引起抗炎介质（如 HSP70）的表达[16]。研究证实，LPS刺激导致肝脏*HSP*70和炎性介质*COX*2、*TNF-α* mRNA表达量显著上升[2,6-7]，同时也使肝脏HSP70、COX2、TNF-α蛋白表达量显著上升[16]。LPS刺激不同生长阶段猪，均会使其肝脏*HSP*70过量表达[17]，添加PUFA则能缓解这一现象。亚麻籽油能显著降低狗白细胞中*HSP70* mRNA 的表达量[18]。Narayanan 等[19]也发现 DHA 能显著降低前列腺癌细胞 HSP70蛋白的表达量。Chen等[8]研究表明，富含EPA和DHA等n-3 PUFA的鱼油缓解了LPS刺激导致的肝脏*COX*2 mRNA和*TNF-α* mRNA表达量的增加，同时也降低了蛋白的表达量。研究也发现，在大鼠酒精脂肪肝模型中鱼油可以降低肝脏*HSP*70、*COX*2、*TNF-α*的mRNA和蛋白表达量[20]。Chen 等[2]研究表明 DHA 能通过抑制炎性介质的表达，缓解肝脏的损伤。Han等[4]发现，亚麻籽油能显著降低由高脂肪饲粮诱导的脂肪肝大鼠肝脏*TNF-α*的mRNA表达量的增加。Jangale 等[3]也发现，日粮添加亚麻籽油或鱼油能显著降低糖尿病大鼠肝脏*NF-κB*、*TNF-α*、*IL*-6的mRNA表达量的增加。本试验结果表明，2.5%亚麻籽油可显著降低*COX*2、*TNF-α*的mRNA表达量，5.0%亚麻籽油可显著降低*TNF-α*的mRNA表达量。因此，亚麻籽油可能通过减少肝脏炎性介质的产生，进而保护肝脏。

为了探究亚麻籽油调节炎症的机制，本试验检测了 TLR4 和 NOD 信号通路关键基因的 mRNA 表达量。TLR4 是 Toll 样受体家族（TLRs）中的重要成员，主要识别 LPS[21]。当 LPS 刺激时，LPS 与 TLR4 结合，将信号传递到胞内。在胞内，TLR4 通过 TIR（Toll/IL-1)区域与 MyD88 羧基端结合，活化 MyD88。活化的 MyD88 能依次激活下游的 IRAK1、TRAF6，最终激活 NF-κB。激活的 NF-κB 转入核内，诱导炎性介质的表达[21]。NOD1 和 NOD2 是 NOD 家族中最具代表性的成员，主要识别肽聚糖（PGN）。NOD1 和 NOD2 都能结合共同的下游分子 RIPK2，并进一步激活 NF-κB，诱导炎性介质的转录[5,22-23]。当动物机体遭受应激或感染时，炎症介质大量产生，导致肝脏出现损伤。因此，我们推测亚麻籽油可能通过调控 TLR4 和 NOD 信号通路，来调节炎性介质的产生，从而发挥对肝脏的保护作用。

本试验发现，LPS 刺激导致 TLR4（*TLR*4、*MyD*88、*IRAK*1、*NF-κB*）和 NOD（*NOD*1、*NOD*2、*RIPK*2）信号通路关键基因 mRNA 表达量显著上升。2.5%亚麻籽油可显著降低 *NOD*1、*NOD*2 的 mRNA 表达量，有降低 *RIPK*2 mRNA 表达量的趋势，5.0%亚麻籽油可显著降低 *NOD*2 的 mRNA 表达量。目前，有关亚麻籽油对肝脏 TLR4 和 NOD 信号通路关键基因表达影响的研究未见报道。前期研究表明，鱼油（富含 EPA 和 DHA）可以降低 LPS 刺激导致的肝脏 *NOD*1、*NOD*2、*RIPK*2 的 mRNA 表达量的增加[8]。同时，鱼油也可显著降低 LPS 刺激引起的肠道、肌肉、下丘脑-垂体-肾上腺轴 NOD 信号通路关键基因的上调表达[24-26]。本试验结果暗示，LPS 刺激诱导仔猪肝脏 TLR4 和 NOD 信号通路关键基因表达，导致炎性介质的释放，从而导致肝脏损伤，而亚麻籽油可通过调控 NOD 信号通路降低 LPS 刺激导致的仔猪肝脏炎性介质上调表达，从而发挥护肝作用。

4 结　论

LPS 刺激诱导仔猪肝脏 TLR4 和 NOD 信号通路关键基因表达，导致炎性介质（*COX*2 和 *TNF-α*）的过量释放。2.5%和 5.0%亚麻籽油可通过抑制 NOD 信号通路，缓解 LPS 刺激导致的仔猪肝脏炎性介质过量表达。

参考文献：

[1] SCHMÖCKER C,WEYLANDT K H,KAHLKE L,et al.Omega-3 fatty acids alleviate chemically induced acute hepatitis by suppression of cytokines[J].Hepatology,2007,45(4):864–869.

[2] CHEN W Y,LIN S Y,PAN H C,et al.Beneficial effect of docosahexaenoic acid on cholestatic liver injury in rats[J].The Journal of Nutritional Biochemistry,2012,23(3):252–264.

[3] JANGALE N M,DEVARSHI P P,DUBAL A A,et al.Dietary flaxseed oil and fish oil modulates expression of antioxidant and inflammatory genes with alleviation of protein glycation status and inflammation in liver of streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats[J].Food Chemistry,2013,141(1):187–195.

[4] HAN H,MA H F,RONG S,et al.Flaxseed oil containing flaxseed oil ester of plant sterol attenuates high-fat diet-induced hepatic steatosis in apolipoprotein-E knockout mice[J].Journal of Functional Foods,2015,13:169–182.

[5] FUKATA M,VAMADEVAN A S,ABREU M T.Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders[J].Seminars in Immunology,2009,21(4):242–253.

[6] 皮定安.天冬酰胺对脂多糖诱导的仔猪肝脏损伤和肌肉蛋白质降解的调控作用[D].硕士学位论文.武汉:武汉轻工大学,2014.

[7] 冷炜博.天冬氨酸对脂多糖诱导的仔猪肝脏损伤和肌肉蛋白质降解的调控作用[D].硕士学位论文.武汉:武汉轻工大学,2014.

[8] CHEN F,LIU Y L,ZHU H L,et al.Fish oil attenuates liver injury caused by LPS in weaned pigs associated with inhibition of TLR4 and nucleotide-binding oligomerization domain protein signaling pathways[J].Innate Immunity,2013,19(5):504–515.

[9] 陈少魁,刘玉兰,李权,等.脂多糖刺激对仔猪下丘脑-垂体-肾上腺轴Toll样受体4信号通路关键基因表达的影响[J].动物营养学报,2014,26(11):3356–3361.

[10] LIVAK K J,SCHMITTGEN T D.Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method[J].Methods,2001,25(4):402–408.

[11] JOHNSON R W.Inhibition of growth by pro-inflammatory cytokines:an integrated view[J].The Journal of Animal Science,1997,75(5):1244–1255.

[12] CHYTILOVÁ M,NEMCOVÁ R,GANCARČÍKOVÁ S,et al.Flax-seed oil and *Lactobacillus plantarum* supplementation modulate TLR and NF-κB gene expression in enterotoxigenic

Escherichia coli challenged gnotobiotic pigs[J].Acta Veterinaria Hungarica,2014,62(4):463–472.

[13] SHI Q,DONG Z,WEI H.The involvement of heat shock proteins in murine liver regeneration[J].Cellular & Molecular Immunology,2007,4(1):53–57.

[14] OKA Y,AKAGI Y,KINUGASA T,et al.Heat-shock pre-treatment reduces liver injury and aids liver recovery after partial hepatectomy in mice[J].Anticancer Research,2013,33(7):2887–2894.

[15] KUBOKI S,SCHUSTER R,BLANCHARD J,et al.Role of heat shock protein 70 in hepatic ischemia-reperfusion injury in mice[J].American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology,2007,292(4):G1141-G1149.

[16] WU H T,LIU Y L,PI D A,et al.Asparagine attenuates hepatic injury caused by lipopolysaccharide in weaned piglets associated with modulation of Toll-like receptor 4 and nucleotide-binding oligomerisation domain protein signalling and their negative regulators[J].British Journal of Nutrition,2015,114(2):189–201.

[17] MCCOMB M A,SPURLOCK M E.Expression of stress proteins in porcine tissues:developmental changes and effect of immunological challenge[J].The Journal of Animal Science,1997,75(1):195–201.

[18] PURUSHOTHAMAN D,BROWN W Y,VANSELOW B A,et al.Flaxseed oil supplementation alters the expression of inflammatory-related genes in dogs[J].Genetics And Molecular Research,2014,13(3):5322–5332.

[19] NARAYANAN N K,NARAYANAN B A,BOSLAND M,et al.Docosahexaenoic acid in combination with celecoxib modulates HSP70 and p53 proteins in prostate cancer cells [J].International Journal of Cancer,2006,119(7):1586–1598.

[20] NANJI A A,GRINIUVIENE B,YACOUB L K.Heat-shock gene expression in alcoholic liver disease in the rat is related to the severity of liver injury and lipid peroxidation[J].Experimental Biology and Medicine,1995,210(1):12–19.

[21] AKIRA S,UEMATSU S,TAKEUCHI O.Pathogen recognition and innate

immunity[J].Cell,2006,124(4):783–801.

[22] TAKEUCHI O,AKIRA S.Pattern recognition receptors and inflammation[J].Cell,2010,140(6):805–820.

[23] ECKMANN L.Sensor molecules in intestinal innate immunity against bacterial infections[J].Current Opinion in Gastroenterology,2006,22(2):95–101.

[24] LIU Y L,CHEN F,ODLE J,et al.Fish oil increases muscle protein mass and modulates Akt/FOXO,TLR4 and NOD signaling in weaning piglets after LPS challenge[J].The Journal of Nutrition,2013,143(8):1331–1339.

[25] LIU Y L,CHEN F,ODLE J,et al.Fish Oil enhances intestinal integrity and inhibits TLR4 and NOD2 signaling pathways in weaned pigs after LPS challenge[J].The Journal of Nutrition,2012,142(11):2017–2024.

[26] LIU Y L,CHEN F,LI Q,et al.Fish oil alleviates activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis associated with inhibition of TLR4 and NOD signaling pathways in weaned piglets after a lipopolysaccharide challenge[J].The Journal of Nutrition,2013,143(11):1799–1807.

Effects of Flaxseed Oil on the mRNA Expression of the Key Genes in TLR4 and NOD Signaling Pathways in Liver of Piglets after LPS Challenge

CHEN Shaokui　LIU Yulan*　WANG Haibo　WANG Xiuying　ZHU Huiling　ZHANG Jing　WANG Shuhui　TU Zhixiao

(*Hubei Key Laboratory of Animal Nutrition and Feed Science, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China*)

Abstract: This experiment was conducted to investigate the effects of flaxseed oil on the mRNA expression of the key genes in toll-like receptor 4 (TLR4) and nucleotide binding oligomerization domain protein (NOD) signaling pathways in liver of piglets after lipopolysaccharide (LPS) challenge. Twenty four pigs with a similar body weight were randomly divided into 4 groups with

---

*Corresponding author, professor, E-mail: yulanflower@126.com　　（责任编辑　李慧英）

6 replicates per group and 1 pig per replicate, and the 4 groups were control group, LPS group, 2.5% flaxseed oil group (2.5% flaxseed oil + LPS), and 5.0% flaxseed oil group (5.0% flaxseed oil + LPS), respectively. The experiment lasted for 21 days. The pigs in the experimental group were injected intraperitoneally with 100 μg/kg body weight LPS, whereas the pigs in the control group were injected with an equivalent amount of sterile saline. At 4 h post-challenge, the pigs were slaughtered and liver samples were collected. The mRNA expression levels of inflammatory cytokines and the key genes in TLR4 and NOD signaling pathways were detected by real-time quantitative PCR. The results showed as follows: 1) After LPS challenge, the mRNA relative expression levels of cyclo-oxygenase 2 (*COX*2), heat shock protein 70 (*HSP*70) and tumor necrosis factor-α (*TNF-α*) in liver were significantly increased ($P<0.05$). The mRNA relative expression levels of *COX*2 and *TNF-α* in 2.5% flaxseed oil group were significantly lower than those in LPS group ($P<0.05$), and the *TNF-α* mRNA relative expression level in 5.0% flaxseed oil group was significantly lower than that in LPS group ($P<0.05$). 2) After LPS challenge, the mRNA relative expression levels of *TLR*4, myeloid differentiation factor 88 (*MyD*88), interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (*IRAK*1), *NOD*1, *NOD*2, receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2 (*RIPK*2) and nuclear factor-κB (*NF-κB*) in liver were significantly increased ($P<0.05$). The mRNA relative expression levels of *NOD*1 and *NOD*2 in 2.5% flaxseed oil group were significantly lower than those in LPS group ($P<0.05$), and the mRNA relative expression level of *RIPK*2 had a tendency to decrease control to the LPS group ($P<0.10$).The mRNA relative expression level of *NOD*2 in 5.0%flaxseed oil group was significantly lower than that in LPS group ($P<0.05$). These results indicate that LPS challenge induces inflammatory response in piglets, flaxseed oil can alleviate liver inflammatory response via NOD signaling pathway inhibition.

Key words: piglets; flaxseed oil; LPS; liver; TLR4; NOD